

УДК 577.113.7

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

ТЕРМОДИНАМИКА ПЕРЕХОДОВ СПИРАЛЬ-КЛУБОК В ДУПЛЕКСНЫХ И ТРИПЛЕКСНЫХ КОМПЛЕКСАХ ОЛИГОАДЕНИЛАТА С ОЛИГОТИМИДИЛАТОМ. ВЛИЯНИЕ КОВАЛЕНТНО ПРИСОЕДИНЕННОГО КРАСИТЕЛЯ

Ю.П. Благой, В.Н. Зозуля, А.С. Щербакова

*Физико-технический институт низких температур им. Б.И.Веркина НАН Украины,
310164, Харьков, пр. Ленина, 47, E-mail: blagoi@ilt.kharkov.ua*

Поступила в редакцию 21 мая 1998 г.

Проведен термодинамический анализ переходов спираль-клубок комплексов олигонуклеотидов $(dA)_{15}$ с $(dT)_{10}$ и $(dT)_{12}$, а также с олиготимидилатом, модифицированным интеркалирующим красителем феназином. При соотношениях нитей 1:1 и 1:2 и значениях $\mu = 0.11$ и 1 с помощью модели «двух состояний» и модифицированной модели «застежка-молния» рассчитаны термодинамические параметры переходов ΔH , ΔS и ΔG и константы равновесия для дуплексных и триплексных структур. Обнаружено отклонение экспериментальных зависимостей от модели «двух состояний» для дуплексов с ковалентно присоединенным феназином. Этот эффект интерпретируется как результат влияния примесного триплексного состояния. С помощью расчетов по модели «застежка-молния» установлено, что концевые группы комплексов находятся в частично разупорядоченном состоянии, степень которого возрастает с повышением температуры. Показано, что укрепление обоих типов комплексов за счет присоединения красителя может быть учтено путем умножения константы связывания комплекса на константу присоединения красителя к комплементарной структуре.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дуплексные и триплексные комплексы олигонуклеотидов, переход спираль-клубок, стабилизация комплексов красителем, модельные теории переходов.

В последнее время большое внимание привлекают исследования дуплексов и триплексов олигонуклеотидов в связи с их важными биологическими функциями [1,2]. Обычно исследуются комплексы, образованные комплементарными пуриновыми и пиримидиновыми олигонуклеотидами за счет уотсон-криковских и хугстиновских связей. Наиболее простыми структурами такого рода являются гомоолигонуклеотидные дуплексы и триплексы, например, $(dA)_n(dT)_n$. Такие комплексы с $n=10$ и $n=19$ исследовались в работах [3-6] при различных условиях, обеспечивающих термическую устойчивость этих структур и моделирующих условия в живой клетке. Стабилизация таких комплексов может осуществляться, в частности, с помощью ковалентного присоединения к одному или двум концам олигов интеркалирующих красителей [7-9].

Обычно присоединение осуществляется с помощью полиметиленового линкера к терминальным фосфатным группам олигонуклеотидов. Однако возможны и другие способы присоединения. В предыдущей работе [10] было исследовано укрепление дуплексов и триплексов, образованных олиго $(dA)_{15}$ и олиго $(dT)_{10}$ за счет

присоединения к 3'-концу олиго(dT)₁₀ нуклеозидного производного интеркалирующего красителя имидазофеназина (Ph). Методом термической денатурации с использованием УФ-спектроскопии и флуоресценции показано повышение температуры перехода в разупорядоченное состояние для дуплексов на ~10⁰ С и для триплексов на (15-20)⁰ С при $\mu=0,1$ и 1. Таким образом, установлено существенное увеличение стабильности этих структур при условиях, близких к физиологическим.

В связи с этим было интересно провести термодинамический анализ процесса образования изученных структур на основе существующих модельных представлений и выявить факторы, обеспечивающие их стабильность. В настоящей работе такой анализ выполнен на основе простой модели «двух состояний» («все или ничего»), а также с использованием так называемой модели «застежка- молния» [11, 12]. В рамках этой модели были получены модифицированные уравнения для описания дуплексов и триплексов, укрепленных «скрепкой» и без нее. Проведено сравнение экспериментальных и расчетных данных. Следует отметить, что, несмотря на кажущуюся простоту изученных комплексов, процесс их образования усложнен возможностью относительного сдвига (проскальзывания) олигонуклеотидов, а также тем, что при распаде комплексов нити олиго(dA)₁₅ находятся в частично упорядоченном состоянии, причем степень упорядочения зависит от температуры. Эти эффекты учитываются в проведенном анализе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез немодифицированных и модифицированных олигонуклеотидов был выполнен в институте Биоорганической химии и Нефтехимии НАН Украины [10].

Во всех экспериментах в качестве растворителя использовали 10 mM Na-какодилатный буфер, pH 7, содержащий 0.5 mM EDTA, приготовленный на деионизованной дистиллированной воде. Исследования проводили при ионной силе раствора $\mu = 0.1$ и/или $\mu = 1$ (для создания ионной силы добавляли NaCl). Концентрации олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически, используя следующие коэффициенты молярной экстинкции ($M^{-1}cm^{-1}$): 9800 при $\lambda=257$ нм для олиго(dA)₁₅, 8600 при $\lambda=266$ нм для олиго(dT)₁₀ и олиго(dT)₁₂ (при 21-23⁰С) [10]. Концентрацию олиго(dT)₁₀Ph рассчитывали по поглощению феназинового остатка в видимой области спектров поглощения [10].

Профили термической денатурации получены путем регистрации температурных зависимостей УФ-поглощения нуклеотидов. Абсорбционные кривые плавления были определены на спектрофотометре SPECORD UV VIS (Jena, ФРГ), подключенном к персональному компьютеру для сбора данных. Поглощение измеряли в специальной кварцевой кювете (объем 60 микролитров, длина оптического пути 0.2 см). Кювета вставлялась в медный держатель, температура которого изменялась с помощью элемента Пелтье, управляемого компьютером. Измерения выполняли в основном при скорости нагрева 0.5⁰С/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Комплексообразование (dA)₁₅ с (dT)₁₀ и (dT)₁₀Ph было исследовано в растворах с молярным соотношением нитей 1:1 и 1:2 при двух значениях $\mu = 0.1$ и 1. Также изучено образование комплексов между (dA)₁₅ и (dT)₁₂ с молярным соотношением нитей 1:1. Концентрация нитей (dA)₁₅ во всех случаях составляла 7 μ M. Кривые плавления вышеуказанных комплексов были получены по изменению

Термодинамика переходов спираль-клубок...

поглощения при $\lambda=260$ нм и $\lambda=284$ нм [10]. Температурная зависимость доли разупорядоченных АТ-пар, $1-\theta$, для комплексов $(dA)_{15}(dT)_{10}$ и $(dA)_{15}(dT)_{10}Ph$ представлена на Рис.1. Значения, $1-\theta$, были рассчитаны из кривых плавления при $\lambda=260$ нм по стандартной методике, используя линейные базовые линии.

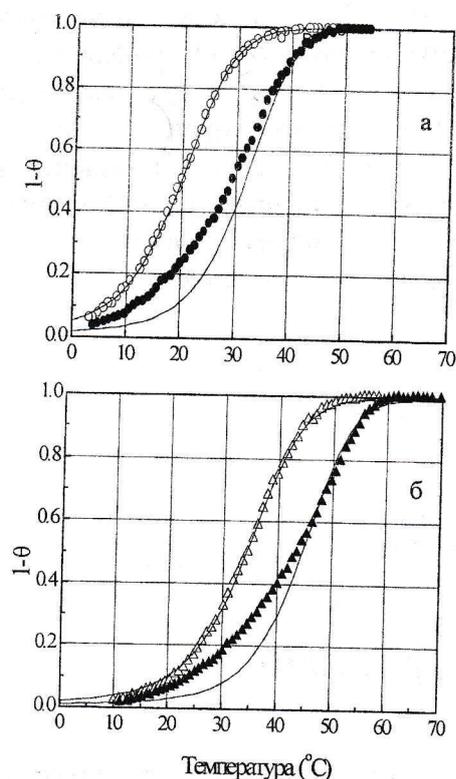


Рис.1 Температурная зависимость доли разупорядоченных АТ-пар в комплексах $(dA)_{15}(dT)_{10}$ (o, Δ) и $(dA)_{15}(dT)_{10}Ph$ (•, \blacktriangle); (а) $\mu=0.1$, (б) $\mu=1$. Плавление проводилось при $\lambda=260$ нм. Здесь и далее точки-экспериментальные данные, сплошные кривые- расчет по модели «застежка-молния»

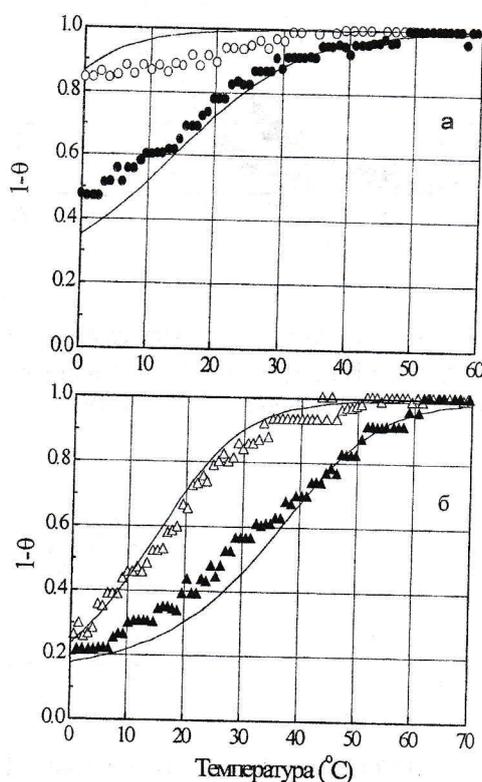


Рис.2 Температурная зависимость доли разупорядоченных хугстиновских пар в комплексах $(dA)_{15} \cdot 2(dT)_{10}$ (o, Δ) и $(dA)_{15} \cdot 2(dT)_{10}Ph$ (•, \blacktriangle), (а) $\mu=0.1$, (б) $\mu=1$. Плавление проводилось при $\lambda=284$ нм.

С целью выявления триплексных формирований в комплексах $(dA)_{15} \cdot 2(dT)_{10}$ и $(dA)_{15} \cdot 2(dT)_{10}Ph$ плавление проводилось при $\lambda=284$ нм. Результаты приведены на Рис.2 в виде температурной зависимости доли разупорядоченных тройных цепей. Данные, приведенные на Рис.2, отчетливо показывают формирование триплексов, в особенности для систем $(dA)_{15} \cdot 2(dT)_{10}Ph$. Однако и при молярном соотношении нитей 1:1 наблюдается небольшое содержание триплексов для системы с феназином (данные приведены в [10]). Как видно из Рис.1 и 2, ковалентно присоединенный к олиготимидилату, Ph повышает температуру плавления дуплексных и триплексных комплексов с $(dA)_{15}$ как при $\mu = 0.1$, так и при $\mu = 1$. Увеличение длины цепи олиготимидилата на 2 нуклеотида приводит к повышению температуры перехода на ~ 17 °C (Рис.3).

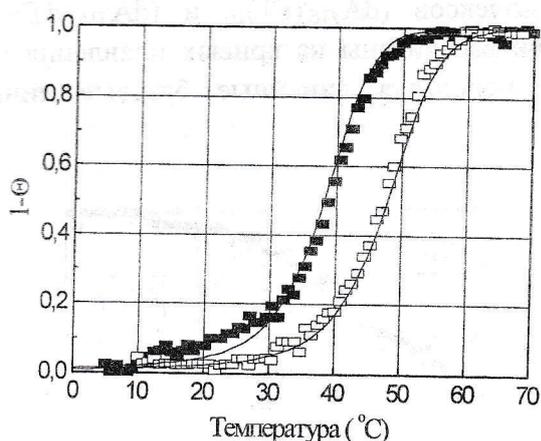


Рис.3 Кривые переходов спираль-клубок в комплексах $(dA)_{15}(dT)_{12}$ при $\mu=0.1$ (■) и при $\mu=1$ (□) (из данных по плавлению при $\lambda=260$ нм).

Модель «двух состояний» («все или ничего») позволяет наиболее просто выполнить термодинамический анализ равновесий в данных системах. В растворе изучаемые олигонуклеотиды могут находиться в трех состояниях: 1) одиночные нити двух типов в разупорядоченной форме; 2) в виде дуплексов; 3) в триплексной форме. В приближении данной модели равновесие между ними можно описать двумя уравнениями:

$$K_{1-2} \cdot c = f_d / \left[(1 - f_d - f_t) \cdot (n - f_d - 2f_t) \right] \quad (1)$$

$$K_{2-3} \cdot c = f_t / \left[f_d \cdot (n - f_d - 2f_t) \right] \quad (2)$$

где c - полная концентрация олигов; f_d и f_t - доли дуплексов и триплексов, соответственно.

При незначительном вкладе триплексов уравнение (1) позволяет легко определить константу K_{1-2} по измеренной доле дуплексных состояний: $K_{1-2} = f_d / [(1 - f_d)^2 c]$ и построить кривую перехода $1 - \Theta = f(T)$. Термодинамические параметры связывания ΔG , ΔH , ΔS могут быть рассчитаны по известным формулам

$$\Delta G = R \cdot T_m \cdot \ln(2 / c) \quad (3)$$

$$\Delta H = 6 \cdot R \cdot T_m^2 \cdot \left(\frac{\partial \theta}{\partial T} \right)_{T_m} \quad (4)$$

$$\Delta S = (\Delta G - \Delta H) / T_m \quad (5)$$

где c - полная концентрация нитей, T_m - температура средней точки перехода

При этом обычно величины ΔH и ΔS предполагаются постоянными, не зависящими от температуры. Энтальпия перехода ΔH может быть вычислена также из зависимости Вант-Гоффа $\ln K_{1-2} = f(1000/T)$. Отклонения от линейного характера этой зависимости свидетельствуют о появлении третьей структуры (фазы) и/или о зависимости ΔH и ΔS от температуры.

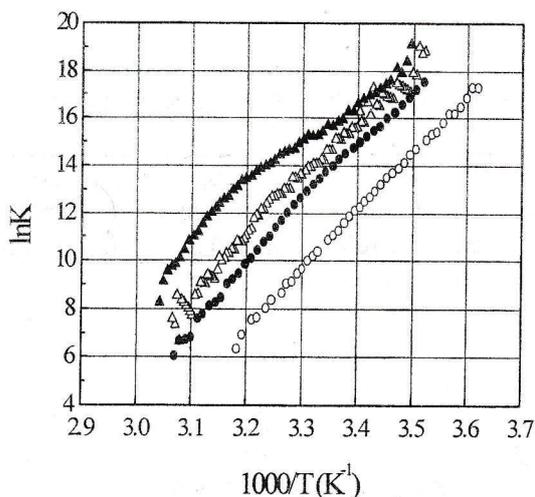


Рис.4 Зависимость Вант-Гоффа для комплексов $(dA)_{15}(dT)_{10}$ и $(dA)_{15}(dT)_{10}Ph$. Использовали данные и обозначения Рис. 1.

Представленные на Рис. 1 и 3 кривые перехода для систем $(dA)_{15}(dT)_{10}$ и $(dA)_{15}(dT)_{12}$, имеют правильную S-образную форму, характерную для чисто дуплексных структур. Но для систем с феназином (рис. 1) это правило не выполняется - кривые плавления, имеют более пологие низкотемпературные участки. Для них также наблюдается отклонения от линейности зависимостей Вант-Гоффа (Рис. 4). Эти особенности могут быть обусловлены наличием триплексных состояний.

При известных константах связывания K_{1-2} и K_{2-3} можно рассчитать доли дуплексов (f_d) и триплексов (f_t) для комплексов с молярным соотношением нитей 1:1. Приближенную оценку f_t/f_d можно сделать также, разделив почленно уравнение (2) на (1).

При этом получим

$$f_t / f_d = (K_{2-3} / K_{1-2}) \cdot [f_d / (1 - f_d - f_t)] \quad (6)$$

При высокой температуре, когда $f_d \ll 1$, отношение $f_t / f_d \rightarrow 0$, то есть вклад триплексов невелик. Легко показать, что для эквимольных растворов олигонуклеотидов величина $1 - f_d - f_t \rightarrow f_t$ при низкой температуре и, так как при этом отношение констант резко уменьшается, происходит также значительное снижение f_t / f_d . Таким образом, только в области перехода, соответствующей нижней части кривых плавления, доля триплексных структур может быть существенной. Оценки вклада триплексов в общую долю упорядоченных структур дали величины в пределах 10-12%, что сравнимо с наблюдаемой величиной отклонений от кривых переходов, характерных для дуплексов.

В таблице 1. приведены рассчитанные по формулам (3-5) с использованием данных, приведенных на Рис.(1-3), значения термодинамических параметров ΔG , ΔH , ΔS для переходов в изученных комплексах. При этом для триплексов предполагалось, что дуплексы вполне сформированы.

Очевидно, что при использовании модели «двух состояний» не учитываются частично разупорядоченные состояния, а рассчитанные термодинамические величины усреднены и являются в значительной мере эффективными величинами, не отражая истинного вклада различных составляющих взаимодействий и структуры

комплекса. Для сравнения в Таблице 1. приведены (в скобках) значения термодинамических величин, рассчитанные по линейным участкам зависимостей Вант-Гоффа. Полученные при этом данные незначительно отличаются от рассчитанных по средней точке кривых перехода.

Таблица 1. Термодинамические характеристики комплексов, рассчитанные по модели «двух состояний»

Система	Тип комплекса, соотношение олигонуклеотидов	μ	t_m , °C	$-\Delta H$, ккал/моль нитей	$-\Delta S$, кал/моль нитейК	$-\Delta G_{Tm}$, ккал/моль нитей
(dA) ₁₅ *(dT) ₁₀	дуплексы, 1:1	0.1	19.7	49 (48.5)	142 (141)	7.4
		1.0	34.8	60 (60.2)	169 (164)	7.85
	триплексы, 1:2	0.1	-	-	-	-
		1.0	≈14	21	-	-
(dA) ₁₅ *(dT) ₁₂	дуплексы, 1:1	0.1	38	79	229	7.8
		1.0	47.5	92	265	8.05
(dA) ₁₅ *(dT) ₁₀ Ph	дуплексы, 1:1	0.1	29	56 (56.3)	160 (160)	7.7
		1.0	44	65 (69.1)	180 (193)	8.1
	триплексы, 1:2	0.1	≈12	20	-	-
		1.0	≈33	26	-	-

Анализ данных, приведенных в Таблице 1., показывает, что энтальпия переходов возрастает при увеличении ионной силы, числа мономеров в цепи, а также при присоединении красителя. Изменения ΔS и ΔG не столь значительны. Кроме того, эти значения удовлетворительно согласуются с данными работ [4,6], полученными для $n=10$ и 19 .

Более полную информацию о свойствах и структуре комплексов можно получить применяя модель «застежка-молния». Эта модель была разработана еще в шестидесятых годах Эпплквистом и Дамлом [11,12]. С использованием модели Изинга, предложенной для нуклеиновых кислот Зиммом [13], были получены уравнения для перехода спираль-клубок в дуплексах олигонуклеотидов в двух приближениях: 1) с возможностью относительного смещения цепочек в дуплексе («staggering zipper») и 2) без смещения («nonstaggering zipper»).

Применение теории для описания дуплексов, образованных самокомплементарными полупротонированными олигоаденилатами, дало удовлетворительные результаты и позволило установить зависимость параметров перехода от термодинамических характеристик оснований [12].

На основе предложенной модели можно получить модифицированные уравнения для переходов спираль-клубок в дуплексных и триплексных комплексах олигонуклеотидов с присоединенным лигандом («скрепкой») и без него.

При образовании дуплексов с числом мономеров в цепях N_1 и N_2 (Рис. 5) число различных микросостояний с n связанными парами равно $(N_1 - n + 1)(N_2 - n + 1)$, а константа K_{1-2} определяется в соответствии с моделью выражениями (7, 8)

$$K_{1-2} = \beta \cdot \sum_{n=1}^{N_1} (N_1 - n + 1) \cdot (N_2 - n + 1) \cdot s^n = \beta L(s) \quad (7)$$

где параметр β - так называемый «фактор ассоциации», а s - константа присоединения новой пары к упорядоченному участку дуплекса [12,13].

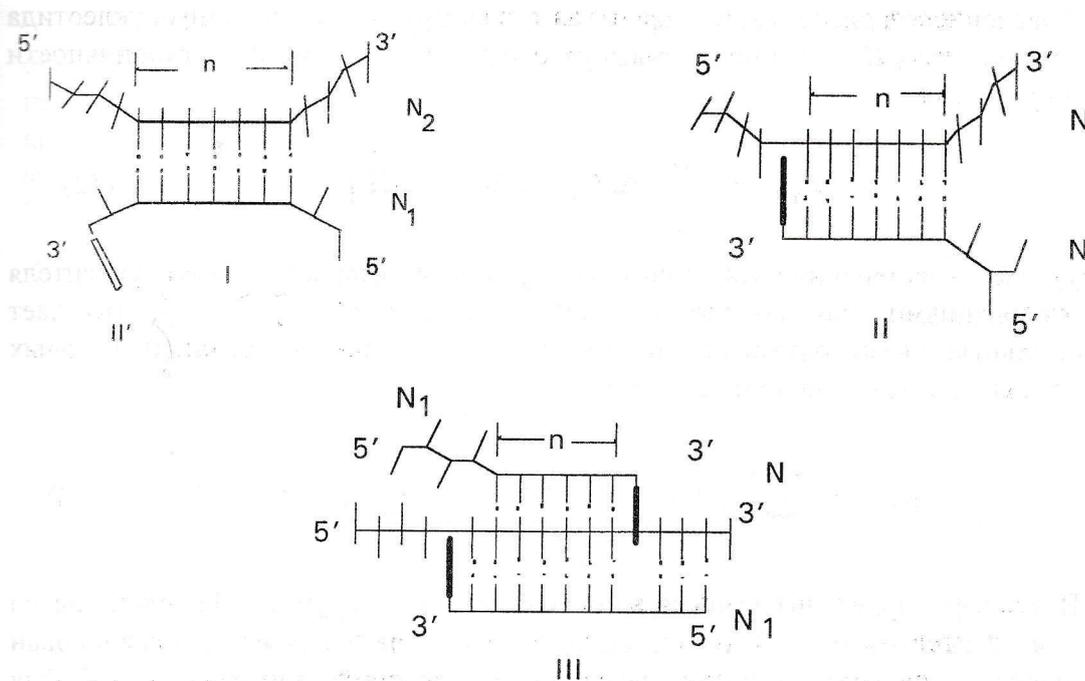


Рис.5 Схема дуплексных (I, II и II') и триплексных комплексов (III), образованных олиго(dA)₁₅ с олиго(dT)₁₀ (I) и олиго(dT)₁₀Ph (II, II', III). Число мономеров в цепях N₁=10, N₂=15; число связанных пар - n. Уотсон-криковские (:), хугстиновские (•) пары оснований.

$$\ln s = \left(\Delta S_s / R \right) - \left(\Delta H_s / RT \right) \quad (8)$$

где ΔH_s и ΔS_s - изменения энтальпии и энтропии в данном процессе, то есть разности этих величин для упорядоченного и разупорядоченного состояний. Доля спаренных нуклеотидов (θ) в соответствии с [12] может быть записана в виде

$$\theta = \left\{ s \left(1 + 4\gamma L(s) - \left[1 + 8\gamma L(s)^{1/2} \right] L'(s) \right) \right\} / \left(4\gamma N_1 L(s) \right) \quad (9)$$

где параметр $\gamma = \beta c$, а c - полная концентрация нитей в растворе. Модель позволяет рассчитать также долю полностью разделенных нитей ($n=0$)

$$\theta_0 = \left\{ \left(1 + 8\gamma L(s) \right)^{1/2} - 1 \right\} / \left(4\gamma L(s) \right) \quad (10)$$

и распределение дуплексов по длинам упорядоченных участков.

$$\theta_n = 2\gamma\theta_0^2 (N_1 - n + 1)(N_2 - n + 1)s^n \quad (11)$$

С помощью этих выражений можно оценить вклад разупорядочения концевых участков (так называемое «растрепывание концов») в общую долю разделенных пар.

Ковалентное присоединение красителя к одному из концов олигонуклеотида повышает константу K_{1-2} , что может быть учтено введением константы стабильности (s_{ph}) для красителя

$$s_{ph} = \exp\left\{\left(-\Delta H_{ph} + T\Delta S_{ph}\right) / RT\right\} \quad (12)$$

где ΔH_{ph} и ΔS_{ph} - изменения энтальпии и энтропии при интеркалировании красителя между основаниями противоположной цепи. Как следует из Рис. 5, это дает дополнительные связи олигонуклеотидов, учет числа микросостояний которых приводит к выражению для констант связывания K_{1-2} .

$$K'_{1-2} = \beta \sum_{n=1}^{N_1} \left\{ s_{ph} (N_2 - n) + (N_1 - n + 1)(N_2 - n + 1) \right\} s^n \quad (13)$$

В этой формуле учитываются микросостояния двух типов: 1) дуплексы со связанным красителем (II) и 2) дуплексы, в которых краситель не интеркалирован (II'). В последнем случае, очевидно, заселенность состояний такова же, как и для олигов без красителя (см. формулу (7)). Число микросостояний первого типа, как видно из формулы (13), меньше, однако при $s_{ph} \gg s$ они могут давать основной вклад в величину K_{1-2} .

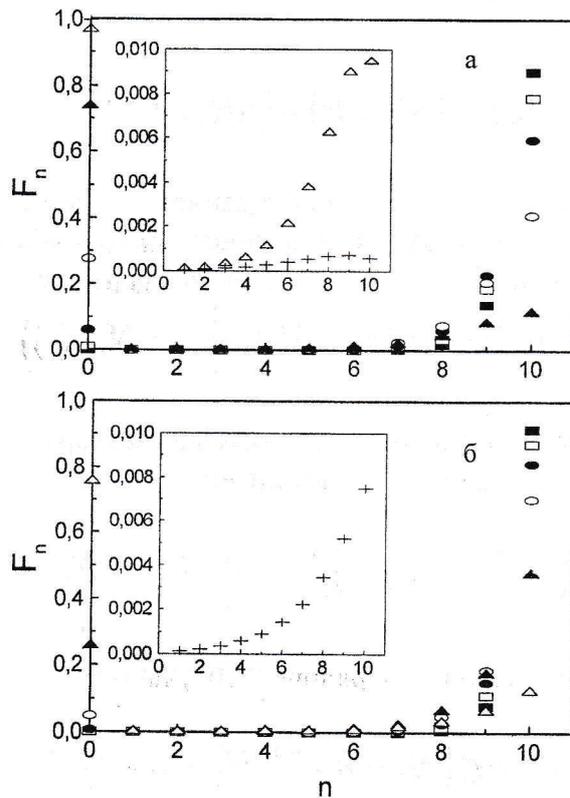


Рис.6 Популяционный анализ для модели «застежка-молния» для дуплексных систем (а) $(dA)_{15}(dT)_{10}$ и (б) $(dA)_{15}(dT)_{10}Ph$ при $\mu=1$. Распределение (■) соответствует 0 °C, (□) - 10 °C, (●) - 20 °C, (○) - 30 °C, (▲) - 40 °C, (△) - 50 °C, (+) - 60 °C

Термодинамика переходов спираль-клубок...

Модель «застежка-молния» может быть использована также для описания образования триплексов, если рассматривать этот процесс как реакцию присоединения третьей нити к уже сформированному дуплексу. Для олигов без красителя такой подход позволяет использовать для расчетов K_{2-3} формулу, аналогичную (7), но при $N_2 = N_1$, так как длины дуплексов и триплексов одинаковы. В этом случае K_{2-3} является константой равновесия для присоединения мономера третьей цепи к дуплексу. В данном случае это присоединение тимина к аденину дуплекса с образованием хугстиновской структуры.

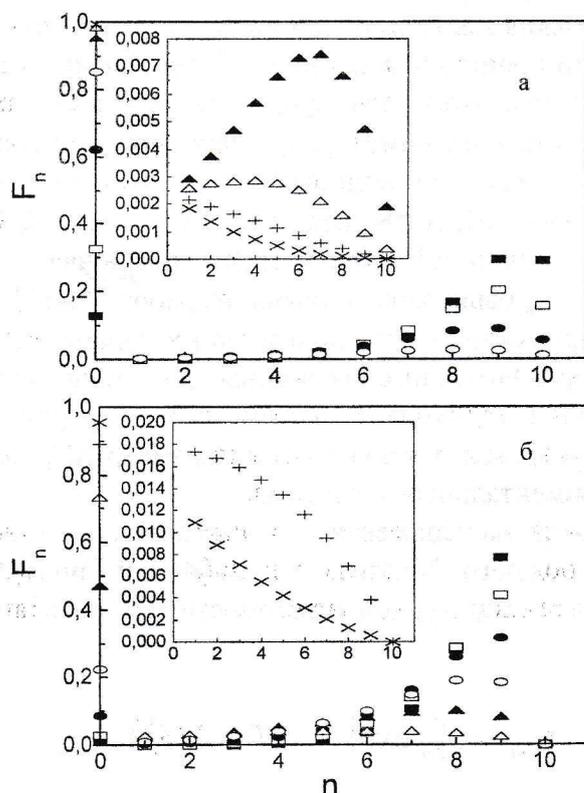


Рис. 7 Популяционный анализ для модели «застежка-молния» для триплексных систем (а) $(dA)_{15} 2(dT)_{10}$ и (б) $(dA)_{15} 2(dT)_{10} Ph$ при $\mu=1$. Распределение (■) соответствует $0^\circ C$, (□) - $10^\circ C$, (●) - $20^\circ C$, (○) - $30^\circ C$, (▲) - $40^\circ C$, (△) - $50^\circ C$, (+) - $60^\circ C$, x - $70^\circ C$

Для олиго $(dT)_{10}$ с присоединенными к 3'-концу «скрепками» (красителями) возможная структура триплекса показана на Рис. 5. При этом учитывается, что нить, образующая хугстиновские связи, присоединена параллельно олиго $(dA)_{15}$, в отличие от уотсон-криковского антипараллельного расположения, и, кроме того, предполагается, что дуплекс полностью сформирован, краситель в дуплексе интеркалирует между аденинами, а краситель третьей (хугстиновской) нити встраивается между уотсон-криковскими парами. Очевидно, возможны состояния, в которых краситель третьей нити свободен (не интеркалирован), но их вклад в общую термодинамику комплексов незначителен. С учетом сделанных предположений выражение для константы связывания триплекса имеет вид

$$K'_{2-3} = \beta \sum_{n=1}^{N_1} \left\{ s_{ph} (N_1 - n) + (N_1 - n + 1)^2 \right\} s^n \quad (14)$$

Как видно, во всех случаях в расчетные формулы входит ряд неизвестных величин, которые при сравнении с опытом могут быть подгоночными параметрами (γ , ΔH_s , ΔS_s), что может снижать значимость экспериментальной проверки теории. В связи с этим для ограничения произвола в выборе параметров и большей однозначности при расчетах использовались дополнительные условия, следующие из физического смысла рассматриваемых величин. Параметр ассоциации β ($\gamma = \beta s$) фактически определяется проигрышем в энтропии при объединении двух цепей. Поэтому его величина должна зависеть от длины цепи, что было установлено в [12]. Кроме того, очевидно, что проигрыш в энтропии будет меньше в случае, когда одна нить упорядочена. С учетом этого для дуплексов при расчетах использовалось значение $\gamma = 10^{-7}$, близкое к полученному в [12], а при описании триплексов - $\gamma = 10^{-5}$, полученное из условий наилучшей подгонки. В соответствии с предпосылками модели Изинга на величины ΔH_s и ΔS_s налагалось условие $\Delta H_s / \Delta S_s = T_p$ (где T_p - температура перехода в полимерной молекуле), что исключало один подгоночный параметр (ΔS_s). Величины T_p были заимствованы из работ [14-16]. Таким образом, в случае отсутствия «скрепки» остается два подгоночных параметра (ΔH_s и γ), и можно использовать две экспериментальные величины для однозначности подгонки: температуру средней точки перехода и наклон кривой перехода в этой точке. Фактически в работе варьировался только один параметр ΔH_s , величину которого можно сравнить с экспериментальными данными.

Для s_{ph} использовали экспериментально определенные ранее [17] величины констант связывания свободного феназина с поли(dA) и поли(dA)поли(dT). Для удобства расчетов и учета температурной зависимости этих констант выражение (12) преобразовалось к виду

$$s_{ph} = s_{ph}^0 \exp\{-\alpha(T - 273)\} \quad (15)$$

где $\alpha = \Delta H_{ph} / RT_0 T_m$, а s_{ph}^0 - значение константы s_{ph} при 0°C , $T_0 = 273\text{ K}$.

Рассчитанные по формулам (7)-(9) кривые перехода для дуплексов представлены на Рис. 1 и 2 сплошными линиями. Используемые при этом параметры приведены в Таблице 2.

Интересно сопоставить полученные значения ΔH_s с величиной ΔH для перехода спираль-клубок в полимерных молекулах. К сожалению, в известной нам литературе отсутствуют данные о температурной зависимости энтальпии плавления поли(dA)поли(dT). В работе [16] методом ДСК получили значения $\Delta H = 8.3$ ккал/моль, не зависящее от концентрации Na^+ , что является удивительным. Это значение можно считать верхним пределом для ΔH_s при высоких концентрациях Na^+ . Можно сравнить изменение ΔH_s с температурной зависимостью энтальпии для систем поли(A)поли(Y). В интервале температур 300-330 K величина ΔH для этой системы изменяется от 6.7 ккал/моль до ≈ 8 ккал/моль [18], что близко к значениям, полученным в настоящей работе. Еще более близкие к нашим данным значения $\Delta H = 6.4-7.6$ ккал/моль для системы поли(A)поли(Y) приведены в работе [19]. Таким образом, можно считать, что подгоночные значения ΔH_s близки к истинным значениям энтальпии для модели Изинга.

Термодинамика переходов спираль-клубок...

Таблица 2. Термодинамические характеристики, использованные при расчете по модели «застежка-молния»

Система	Тип комплекса, соотношение олигонуклеотидов	μ	t_m , °C	$-\Delta H_s$, ккал/моль пар осн.	$-\Delta S_s$, кал/моль пар осн. К	γ	S_{ph}^0	α , К ⁻¹
(dA) ₁₅ *(dT) ₁₀	дуплексы, 1:1	0.1	19.7	5.8	17.04	10 ⁻⁷		
		1.0	34.8	6.1	17.09	10 ⁻⁷		
	триплексы, 1:2	0.1	-	3.5	11.38	10 ⁻⁵		
		1.0	≈14	3.85	11.38	10 ⁻⁵		
(dA) ₁₅ *(dT) ₁₂	дуплексы, 1:1	0.1	38	7.4	21.45	10 ⁻⁷		
		1.0	47.5	7.4	20.73	10 ⁻⁷		
(dA) ₁₅ *(dT) ₁₀ Ph	дуплексы, 1:1	0.1	29	5.8	17.04	10 ⁻⁷	300	0.05
		1.0	44	6.1	17.09	10 ⁻⁷	300	0.05
	триплексы, 1:2	0.1	≈12	3.5	11.38	10 ⁻⁵	2000	0.05
		1.0	≈33	3.85	11.38	10 ⁻⁵	2000	0.05

Как видно из Рис.1 и 2, расчетные кривые хорошо описывают экспериментальные зависимости для комплексов без феназина, отражая их форму во всей области перехода. В то же время для систем с феназином, как и в случае модели двух состояний, наблюдаются отличия зависимостей в нижних частях кривых. Как указывалось выше, это различие может быть обусловлено образованием, наряду с дуплексными, триплексных форм, что может быть объяснено значительно более сильной стабилизацией красителем триплексов по сравнению с дуплексами, что следует из сравнения величин S_{ph} для этих структур (Таблица 2).

При анализе структуры дуплексов важным вопросом является степень их упорядоченности, которая может нарушаться за счет разупорядочения концевых участков, так называемого «растрепывания концов» [12] (Рис. 5). Модель «застежки-молнии» позволяет оценить величину этого эффекта. На Рис. 6 показано распределение дуплексов по длинам упорядоченных участков, рассчитанное по уравнению (11) для систем (dA)₁₅(dT)₁₀ и (dA)₁₅(dT)₁₀Ph. Как видно из рисунка, в обоих случаях даже в начале перехода доля дуплексов с разупорядоченными концами составляет 20-30%, и она возрастает с повышением температуры. Разупорядочение концов дуплексов может быть причиной заниженного значения энтальпии перехода, определенной по модели двух состояний (см. Таблицу 1). Следует отметить, что эффект «растрепывания концов» дуплексов и триплексов возрастает с длиной дуплекса и уменьшением параметра s . Это может быть одной из причин неадекватности модели двух состояний, установленной в [4].

Расчеты по модели «застежки-молнии» для триплексов дают в целом удовлетворительное согласие с экспериментом, особенно если учесть более высокие погрешности опыта и разброс точек (Рис. 2). И использованные при этих расчетах термодинамические данные ΔH_s и ΔS_s (Таблица 2), а следовательно, и параметр s существенно меньше, чем для дуплексов, поскольку они определяются присоединением только одного тимина к хугстиновской цепи. Это обуславливает меньшую стабильность триплексов, весьма широкие интервалы переходов и большее разупорядочивание концов триплексов (Рис. 7). Однако, как отмечалось выше, присоединение красителя к тимину сильнее повышает стабильность триплекса по сравнению с дуплексом, что связано с большим значением параметра s_{ph} . Величина этого параметра определяется константой связывания красителя с

двунитевой молекулой поли(dA)поли(dT) и превышает соответствующую константу для однонитевой поли(dA) примерно на порядок [17].

ВЫВОДЫ

Анализ полученных в работе данных и сравнение их с результатами других работ показывает, что присоединение красителя в виде нуклеозидного производного может обеспечивать более энергетически выгодное укрепление как дуплексов, так и триплексов, чем присоединение на линкере. Это обусловлено тем, что короткий линкер (2-3 звена) может не обеспечивать стерически правильного встраивания красителя между основаниями олигонуклеотида, а длинный линкер дает проигрыш в энтропии. Модель «двух состояний» позволяет оценивать усредненные термодинамические характеристики комплексов. Модифицированная модель «застежка-молния» адекватно описывает переходы спираль-клубок как в дуплексах, так и в триплексах, в том числе для олигонуклеотидов с присоединенным красителем, с учетом реальной структуры комплексов.

Авторы выражают благодарность И.Я. Дубею и Д.М. Федоряку за предоставление олигонуклеотидов, и С.А. Егупову за помощь в математической обработке результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зенкова М.А., Карпова Г.Г. // Успехи химии. 1993. Т.62. № 4. С.414-434
2. Frank-Kamenetskii M.D., Mirkin S.M. // Annu. Rev. Biochem. 1997. V.64. P.65-95
3. Pilch D.S., Levenson C., Shafer R.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990. V.87. P.1942-1946
4. Hopkins H.P., Hamilton D.D., Wilson W.D., Zon G. // J. Phys. Chem. 1993. V.97. P.6555-6563
5. Kibler-Herzog L., Kell B., Zon G., Shinozuka K., Mizan Sh., Wilson W.D. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 3545
6. Pilch D., Brousseau R., Shafer R.H. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 5743-5750
7. Goodchild J. // Bioconjugate Chem. 1990. V.1. P. 165-187
8. Asseline U., Delarue M., Lancelot G., Toulme F., Thuong N.T., Montenay-Garestier T., Helene C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984. V.81. P.3297-3301
9. Lokhov S.G., Podyminogin M.A., Sergeev D.S., Silnikov V.N., Kutuyavin I.V., Shishkin G.V., Zarytova V.P. // Biocojugate Chem. 1992. V3. P. 414-419
10. Зозуля В.М., Благой Ю.П., Дубей И.Я., Федоряк О.Д., Щербакова А.С., Федоряк Д.М. // Биополимеры и клетка. 1998. Т.14. С. 1-8
11. Applequist J. // J. Phys. Chem. 1963. V.38. P. 934
12. Applequist J., Damle V. // J. Am. Chem. Soc. 1965. V.87. P. 1450
13. Zimm B.H. // J. Phys. Chem. 1960. V.33. P. 1349
14. Riley M., Maling B., Chamberlin M. // J. Mol. Biol. 1966. V. 20. P. 359-389
15. Klump H.H. // Can. J. Chem. 1988. V. 66. P. 804-811
16. Hopkins H.P., Hamilton D.D., Wilson W.D., Campbell J., Fumero J. // J. Chem. Thermodynamics. 1993. V.25. P.111-126
17. Zozulya V., Blagoi Yu., Lober G., Voloshin I., Winter S., Makitruk V., Shalamay A. // Biophysical Chem. 1997. V. 65. P. 55-63
18. Krakauer H., Sturtevant J.M. // Biopolymers. 1968. V.6. P. 491
19. Martin F.H., Uhlenbeck O.C., Doty P. // J. Mol. Biol. 1971. V. 57. P. 201